

氏名（本籍）	木下喬公	（奈良県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	甲第1187号	
学位授与日付	令和4年3月25日	
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当	
学位論文題目	Endothelial cell-specific reduction of heparan sulfate suppresses glioma growth in mice	
審査委員	（主査）教授	山口 瞬
	（副査）教授	下畑 享良 教授 秋山 治彦

論文内容の要旨

膠芽腫はその高い浸潤能と血管新生能力から、最も急激に進行する中枢神経原発悪性腫瘍の一つである。外科的切除、放射線治療および化学療法を組み合わせることが現在の標準治療であるが、膠芽腫患者の予後は不良である。膠芽腫の特徴である血管新生を制御するために様々なアプローチが試みられているが、未だ生存期間の改善には至っておらず、予後の改善を来すための新たな手段が期待されている。

ヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPGs）は、コアプロテインとヘパラン硫酸（HS）が結合した糖複合体であり、細胞表面や細胞外基質に存在している。血管内皮増殖因子 A（VEGFA）や塩基性線維芽細胞成長因子（FGF2）といった血管新生因子が作用するためには HSPGs が必要であるが、腫瘍関連血管内皮細胞における HS が膠芽腫の増殖に与える影響は未だ不明である。

本研究では、HS の糖鎖骨格の合成酵素である exostosin glycosyltransferase 1（Ext1）をコードする *Ext1* 遺伝子を、マウスにおいて血管内皮細胞特異的に欠失させ、血管内皮細胞の HS が膠芽腫の増殖に与える影響を評価した。

【対象と方法】

Ext1^{flox/flox} マウスと *VE-cadherin-Cre* マウスを交配し、血管内皮細胞特異的に *Ext1* 遺伝子を欠失したコンディショナルノックアウトマウス (*Ext1*^{CKO}) を作製した。最初に、*Ext1*^{CKO} マウスに *LSL-tdTomato* レポーターマウスをさらに交配し、遺伝子改変が血管内皮細胞特異的に導入されているか検討を行った。また、血管内皮細胞を分離して Ext1, HS それぞれの特異抗体で染色することにより Ext1 の消失や HS の低下を検証した。次に、8-12 週齢の C57BL/6J マウス [*Ext1*^{CKO} 及びコントロール (*Ext1*^{flox/flox}, *Ext1*^{flox/+} または *Ext1*^{+/+})] に GL261 マウス膠芽腫細胞株を同種同所性に移植し、膠芽腫の増殖に与える影響を確認した。さらに、Microarray や定量リアルタイム RT-PCR 解析を用いて腫瘍組織の遺伝子変化に関して検討を行った。

血管内皮細胞特異的な *Ext1* 遺伝子の欠失が血管新生に与える影響に関しては腫瘍組織の免疫組織化学染色のほか、Matrigel Angiogenesis Assay を用いて検討を行った。特に FGF2 は、リガンドとして血管内皮細胞のレセプター (FGFR) に結合して血管新生を促進する際に、HS との結合により極めて高い活性を示すことが報告されていることから、FGF2 の有無による血管新生能力の変化に関して両群で評価を行った。

【結果】

Ext1^{CKO};LSL-tdTomato マウスの組織を用いて血管内皮細胞を認識する CD31 抗体の蛍光免疫組織化学染色を行い、遺伝子改変が血管内皮細胞特異的に導入されていることを確認した。また、血管内皮細胞を分離して Ext1, HS それぞれの特異抗体で染色することによって、Ext1 及び HS が遺伝子改変細胞で有意に減少していることを確認した ($p < 0.05$)。膠芽腫移植モデルでは、コントロール群と比較して、*Ext1^{CKO}* 群の腫瘍面積が有意に減少しており、生存曲線解析では生存期間の有意な増加を認められた ($p < 0.05$)。Microarray や定量リアルタイム RT-PCR 解析では血管新生に関わる *VEGFA* や *FGF2* の遺伝子の発現に有意な変化は認めなかったが、*Ext1^{CKO}* 群では腫瘍内血管の有意な減少を認めた ($p < 0.05$)。

Matrigel Angiogenesis Assay を用いた検討では FGF2 含有 Matrigel を用いたコントロール群において他群 (*Ext1^{CKO}* 群及び FGF2 を含まない Matrigel を用いたコントロール群) より有意な新生血管の増加を認め ($p < 0.01$)、FGF2 の有無による新生血管の増加割合からは *Ext1^{CKO}* 群の FGF2 への反応性が低下していることが示唆された。また、phospho-ERK1/2 (pERK1/2) の免疫組織化学染色においても *Ext1^{CKO}* 群では発現が低下しており、反応性の低下を示唆する所見であった。

【考察】

本研究では、血管内皮細胞の HS が膠芽腫の増殖に与える影響を評価した。膠芽腫移植モデルの結果からは、血管内皮細胞の HS が膠芽腫の増大に影響を与え、血管内皮細胞の HS の減少により腫瘍面積の減少、及び生存期間の改善を認めることが確認された。

また、血管新生に関わる遺伝子である *VEGFA* や *FGF2* の変化を伴っていないにも関わらず腫瘍内血管が有意に減少していることから、血管内皮細胞の HS が腫瘍内血管新生に大きな役割を果たしていることが確認された。特に、Matrigel Angiogenesis Assay や pERK1/2 の免疫組織化学染色の結果から血管内皮細胞の HS が FGF2 の活性に重要であることが示された。

【結論】

血管内皮細胞の HS が腫瘍内血管新生を介して腫瘍増大に重要な影響を与えることが確認された。また、血管内皮細胞の HS を抑制することにより膠芽腫細胞移植マウスの生存期間の有意な延長を認めた。これらの結果は、血管内皮細胞の HS が膠芽腫患者への効果的な治療選択肢となり得ることを示している。

論文審査の結果の要旨

申請者 木下喬公は、exostosin glycosyltransferase 1 (ヘパラン硫酸[HS] の糖鎖骨格の合成酵素) をコードする遺伝子を血管内皮細胞特異的に欠失させたマウス (*Ext1^{CKO}*) を作製し、このマウスの血管内皮細胞で HS の発現が低下していることを示した。そして *Ext1^{CKO}* マウスと対照群マウスの脳内にマウス膠芽腫細胞を移植し、比較することで、血管内皮細胞の HS が腫瘍内血管新生を介して腫瘍の増大に関わること、さらに血管内皮細胞の HS の発現が低下したマウスでは、膠芽腫細胞を移植しても生存期間が有意に長くなることを示した。本研究の成果は、腫瘍病理学および膠芽腫に対する治療法の開発に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

Takamasa Kinoshita, Hiroyuki Tomita, Hideshi Okada, Ayumi Niwa, Fuminori Hyodo, Tomohiro Kanayama, Mikiko Matsuo, Yuko Imaizumi, Takahiro Kuroda, Yuichiro Hatano, Masafumi Miyai, Yusuke Egashira, Yukiko Enomoto, Noriyuki Nakayama, Shigeyuki Sugie, Kazu Matsumoto, Yu Yamaguchi, Masayuki Matsuo, Hideaki Hara, Toru Iwama, Akira Hara : Endothelial cell-specific reduction of heparan sulfate suppresses glioma growth in mice Discover Oncology volume 12, Article number: 50 (2021). doi: 10.1007/s12672-021-00444-3